

Fluorescenční spektroskopie

Zadání úlohy:

1) Seznamte se s blokovým schématem a principem činnosti spektrofluorimetru Jasco FP-8500.

Uved'te spektrofluorimetr do chodu a seznamte se s jeho ovládáním.

2) Změřte 3-dimenzionální (3D) spektrum (excitačně-emisní) anorganických luminoforů

a) ZnS(Cu) a

b) Y₂O₂S(Eu).

Najděte excitační vlnovou délku s maximální intenzitou luminiscence. Změřte emisní spektra luminoforů při této excitační vlnové délce. V protokolu diskutujte rozdíly v naměřených emisních spektrech těchto dvou luminoforů.

3) Využitím mikrovlnné syntézy a dle pokynů vedoucího této praktické úlohy si připravte zlaté a zlato/stříbrné nanoklastry s albuminem z hovězího krevního séra (BSA).

4) Změřte fluorescenční emisní spektra připravených BSA-Au a BSA-AuAg nanoklastrů: nejprve si změřte 3D spektrum a na jeho základě zvolte excitační vlnovou délku s maximální intenzitou luminiscence; teprve pak detailně proměřte emisní a v tomto případě také excitační spektra připravených nanoklastrů. Do protokolu z této praktické úlohy porovnejte emisní spektra připravených Au a AuAg nanoklastrů (poloha maxima a intenzita při stejném nastavení). Diskutujte rozdíly v excitačních spektrech připravených Au a AuAg nanoklastrů.

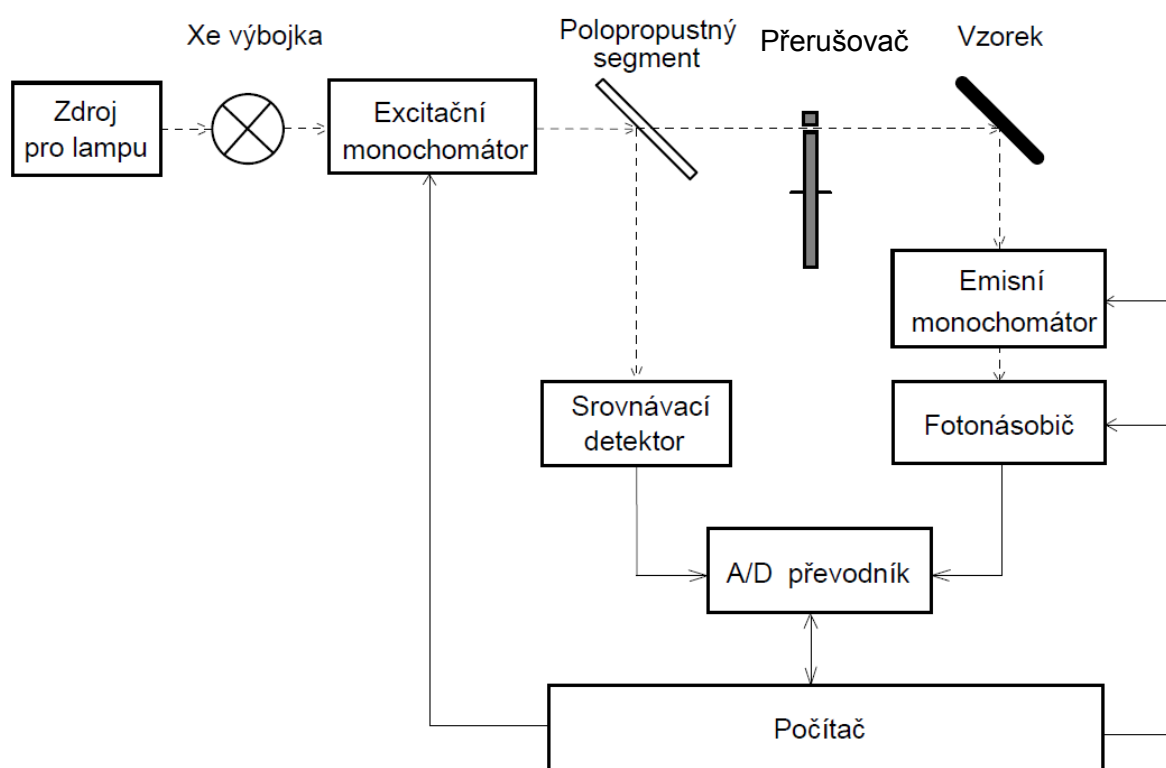
Seznam pomůcek a chemikálií:

- Spektrofluorimetr Jasco FP-8500
- Anorganické luminofory ZnS(Cu) a Y₂O₂S(Eu) deponované na sklíčku
- Mikrovlnná trouba SMW 3717
- Kádinky pyrex (2 ks), míchadla (2 ks), vytahovadlo míchadel, pinzeta
- Skleněná kádinka pro přípravu směsi roztoků H₂AuCl₄·3H₂O a AgNO₃
- Automatické pipety (pro objemy: 0,5-5 mL, 100-1000 μL a 20-200 μL)
- Magnetická míchačka
- Příslušná navážka BSA (albumin z hovězího krevního séra)
- Zásobní roztoky: 10mM H₂AuCl₄·3H₂O (udržovat v temnu), 10 mM AgNO₃ (udržovat v temnu), 1 M NaOH
- Křemenná kyveta pro fluorescenční měření (2 ks)
- Skleněné vialky s víčkem pro uskladnění vzorků (pro jejich další použití při měření na fluorescenčním mikroskopu)
- Exsikátor skříňový s vlhkoměrem a s ochranou proti UV - pro skladování hygroskopických a světlo-citlivých chemikálií (H₂AuCl₄·3H₂O, AgNO₃)

Teorie:

Blokové schéma spektrofluorimetru:

Měření budeme provádět na spektrofluorimetru FP-8500 (Jasco), který je plně ovládaný počítačem. Světelný svazek pocházející z xenonové výbojky vchází do mřížkového excitačního monochromátoru, který vybírá vhodnou vlnovou délku k excitaci fluorescence (obr. 1). Na polopropustném segmentu je výstupní svazek rozdělen na měřicí a srovnávací. Měřicí svazek je modulován průchodem přes přerušovač, poté dopadá na vzorek, kde budí emisi fluorescenčního záření. Emisní monochromátor skenuje fluorescenční emisní spektrum pro danou excitační vlnovou délku. Detektorem intenzity fluorescenčního signálu po průchodu emisním monochromátorem je fotonásobič. Signál z fotonásobiče je zesílen a digitalizován. Naměřená data jsou uložena do paměti počítače. Srovnávací svazek excitačního světla dopadá na samostatný srovnávací detektor. Podílem signálu z fotonásobiče a signálu ze srovnávacího detektoru je automaticky prováděna korekce na spektrální charakteristiku zdroje excitačního svazku.



Obr. 1: Blokové schéma spektrofluorimetru FP-8500:
prerušované šipky značí světelný signál, zatímco plné šipky signál elektrický.

Korekce fluorescenčních spekter:

Obecně je fluorescenční spektrum zatíženo řadou zkreslujících efektů. K základním zkreslujícím efektům patří přístrojové efekty a spektrálně optické efekty ve vzorku.

Přístrojové efekty:

- Spektrální charakteristika budícího světelného zdroje
- Spektrální propustnost všech prvků excitační a detekční soustavy
- Spektrální citlivost fotokatody fotonásobiče
- Závislost spektrální a geometrické šířky štěrbinu monochromátoru (souvisí s disperzí)

- Přístrojová funkce monochromátoru
- Stupeň polarizace detekované fluorescence a jiné

Praktická korekce přístrojových efektů:

Ke korekčním kalibračním měřením se používá standardní emisní lampa (obvykle kalibrovaná žárovka), detektor o známé křivce spektrální citlivosti (např. vakuový optický termočlánek) nebo luminiscenční standard.

Moderní spektrofluorimetry dovolují přístrojové zkreslující efekty eliminovat automaticky nebo pomocí programových procedur zabudovaných přímo do ovládacího menu řídicího systému. U spektrofluorimetru FP-8500 je korekce na spektrální charakteristiku excitačního svazku zajištěna zařazením přidavného srovnávacího detektoru (obr. 1). Spektrální závislost propustnosti celé excitační soustavy lze eliminovat proměřením excitačního spektra známého standardu (rhodamin B v ethylenglykolu, 5,5 g/L). Korekční hodnoty se ukládají do paměti řídicího počítače. Zkorigované excitační soustavy může být použito ke korekci detekční soustavy spektrofluorimetru (emisní monochromátor a detektor). K tomuto účelu se používá měření intenzity světla rozptýleného na difúzním segmentu při synchronním měřícím módu (to je s paralelní změnou vlnové délky excitačního a emisního monochromátoru).

Spektrálně optické efekty ve vzorku:

- Reabsorpce fluorescence
- Sekundární fluorescence
- Efekt vnitřního filtru
- Spektrální závislost odrazivosti a rozptylu světla
- Nehomogenní absorpce

Při měření fluorescenčních spekter silně zředěných roztoků (absorbance < 0,05) lze spektrálně optické efekty ve vzorku považovat za zanedbatelné.

Ohyb na mřížce excitačního monochromátoru:

Spektrofluorimetr Jasco FP-8500 používá pro excitační i emisní monochromátor optickou mřížku a ne optický hranol. Na optické mřížce dochází k ohybu světla, jehož výsledkem je ohybové spektrum s ohybovými maximy a minimy. Světlo „vycházející“ z mřížky však také vzájemně interferuje a tato interference je charakterizována příslušným interferenčním spektrem. Optické mřížky jsou konstruovány tak, aby se „nechtěné“ ohybové a interferenční jevy maximálně vzájemně vyloučily. Nicméně i tak, na výstupu excitačního monochromátoru lze detekovat ne jenom světlo o požadované vlnové délce, ale i světlo s celočíselnými násobky požadované vlnové délky. Jinými slovy, daný vzorek je ozařován ne jenom světlem o požadované vlnové délce, ale i světlem o vlnové délce celočíselných násobků požadované vlnové délky. Je proto třeba vhodně volit excitační vlnovou délku a detekovaný interval emisních vlnových délek (při měření emisního spektra), aby násobek excitační vlnové délky nezasahoval do detekovaného intervalu emisních vlnových délek. Pokud tento požadavek nelze realizovat, musíme se být vědomi, že součástí měřeného signálu je i „artefakt“, který nemá se spektrálními vlastnostmi vzorku nic společného. Tento artefakt je vidět při měření 3D spekter anorganických luminoforů v této úloze.

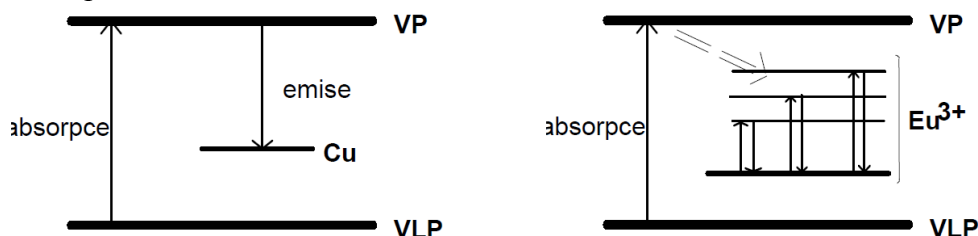
Výše popsaná vlastnost optických mřížek se nevyskytuje u optických hranolů, kde se výběr požadované vlnové délky světla děje na základě lomu světla. Optické hranoly však mají malou světelnost (hodně světla se ztratí při průchodu hranolem) a mají nelineární závislost geometrické šířky štěrbin na optické šířce štěrbin. Optické mřížky, oproti optickým hranolům, nepohlcují tolik světla a závislost geometrické na optické šířce štěrbin je lineární. Z těchto důvodů jsou monochromátory založené na optické mřížce více časté.

Luminiscence krystalů

Krystalické luminiscenční materiály se nazývají luminofory. Většina luminoforů patří buď k polovodičům se širokým zakázaným pásem nebo k izolátorům. Obě tyto skupiny látek jsou charakterizovány zaplněným valenčním pásem (VLP) a prázdným vodivostním pásem (VP), šířka zakázaného pásu (ZP) mezi nimi bývá kolem 3 eV nebo větší – obr. 2. Luminiscenční vlastnosti takových látek jsou závislé na existenci různých poruch jejich krystalové struktury, především na přítomnosti cizích atomů. Pokud tyto příměsi přímo ovlivňují emisní spektrum luminoforu, nazýváme je aktivátory. Jiné příměsi, které neovlivňují luminiscenční spektrum, ale mají vliv např. na doznívání (vytváření tzv. elektronových pastí) nebo na zachování elektrické neutrality mřížky apod., se nazývají koaktivátory.

Přítomnost aktivátorů a koaktivátorů se projeví v pásovém modelu luminoforu existencí disktrétních hladin energie v ZP. Luminiscence pak vzniká přechodem elektronu z VP do VLP (hranová emise, pásové spektrum), případně emise excitonová (čárové spektrum, pozorovatelné za nízkých teplot) nebo přechodem elektronu z VP na aktivátorovou hladinu (luminiscenční centrum), případně přechodem elektronu z aktivátorové hladiny do VLP. Protože tyto případy luminiscence jsou spojeny s rekombinací elektronu a díry, nazývá se tato luminiscence rekombinační a je i pro ni typické pásové emisní spektrum. Buzení luminiscence v těchto případech nastává po absorpci vhodné energie přechodem elektronu z VLP do VP. K luminoforům tohoto typu patří především sulfidy (např. ZnS nebo CdS), aktivované Cu, Ag nebo Au. Jejich emise nastává v závislosti na druhu a koncentraci aktivátoru v modré až zelené části spektra.

Vzniká-li luminiscence v důsledku přechodu elektronu mezi vzbuzeným a základním stavem příměsi, které jsou většinou lokalizovány v ZP luminoforu, jedná se o nerekombinační luminiscenci. Příkladem takového materiálu je $Y_2O_3:Eu^{3+}$. Takový luminofor lze excitovat přechodem elektronu z VLP do VP, ale i přímým buzením aktivátoru, které je ovšem podstatně méně pravděpodobné. Emisní spektrum takových luminoforů je čárové, excitační spektrum by vedle pásu v oblasti absorpční hrany mělo vykazovat i slabší čáry odpovídající přímé excitaci příměsi.



Obr. 2. Luminiscence krystalů - vlevo: pásové schéma energií v ZnS(Cu); vpravo: pásové schéma energií v $Y_2O_3(Eu)$. Jednoduché šipky značí absorpci (šipka nahoru) a emisi (šipka dolů), zatímco dvojitá přerušovaná šipka značí nezářivý přenos energie.

Nanočástice a nanoklastry vzácných kovů

Vzácné kovy v rozměrech nanometrů a subnanometrů, především zlato a stříbro, jsou známy již po staletí svými význačnými optickými vlastnostmi; vzpomeňme např. Lykurgovy pohárky [1], v nichž jsou prokazatelně obsaženy nanočástice zlata či stříbra [2]. Teprve v minulém století začaly být díky technickému a znalostnímu pokroku nanočástice a nanoklastry vzácných kovů detailně zkoumány a jejich unikátní optické vlastnosti (zesílení absorpce, emise a rozptylu) cíleně využívány ve spektroskopiích [3-6]. Tyto spektroskopie založené na

zesílení optických jevů mohou být aplikovány mimo jiné v bio-analytice [7], lékařství [8] či ve forenzních vědách [9].

Nanoklastry, které obsahují desítky až několik desítek atomů vzácných kovů, jsou jistým velikostním mezistupněm mezi atomy a nanočásticemi, a svým chováním jsou tudíž odlišné od atomů anebo nanočástic; bývají přirovnávány k molekulám [10]. Vzhledem ke svému rozměru, který je srovnatelný s Fermiho vlnovou délkou elektronů (0,5-0,7 nm), vykazují diskrétní elektronické stavy a fluorescenci závislou na jejich velikosti [10]. Jejich fotofyzikální vlastnosti a snadná funkční modifikace jejich povrchu jsou v mnohém daleko lepší než běžně dostupné fluorescenční značky [10]. Na rozdíl od polovodičových kvantových teček, jež obsahují těžké kovy (např. kadmium), fluorescenční nanoklastry ze vzácných kovů jsou převážně považovány za netoxické, a není proto divu, že jsou využívány pro značení entit v bio-aplikacích, ať už při zobrazování v biologii či dokonce teranostiku v medicíně [10-12]. Hitem posledních pár let jsou bimetalické nanoklastry, v nichž jsou kombinovány výtečné vlastnosti dvou kovových složek (např. Au a Ag), a to takovým způsobem, že často dochází k synergickému efektu [13].

Podle příslušné aplikace je důležité vybrat a optimalizovat vhodnou syntézu nanomateriálů (míněno nanočástic či nanoklastrů). S ohledem na všeobecné povědomí o zhoršující se kvalitě životního prostředí a také vzhledem ke snaze snižovat toxicitu synteticky připravených nanomateriálů začaly být v posledním desetiletí pro syntézy a stabilizaci nanomateriálů využívány především sloučeniny, které se přirozeně vyskytují v organismech. Jedním takovým příkladem je i využití albuminu z krevního séra hovězího dobytka (BSA) [14]. Tato hojně citovaná, velice jednoduchá syntéza zlatých nanoklastrů [14] však trvala 12h, a proto bylo snahou mnoha dalších vědeckých týmů zkrátit dobu přípravy fluorescenčních Au nanoklastrů s BSA. Jednou z možností je využití mikrovlnného záření, které jednak prohřívá vzorek homogenně, jednak vede ke tvorbě uniformních a monodisperzních nanoklastrů [15], a to dokonce za použití standardní kuchyňské mikrovlnné trouby [16].

V rámci této praktické úlohy si vyzkoušíte připravit své vlastní zlaté a zlato/stříbrné fluorescenční nanoklastry s BSA a ověříte jejich fluorescenční vlastnosti. Využijete (i) reakce vodorozpustné tetrachlorozlatité kyseliny (HAuCl_4) a BSA v alkalickém prostředí urychlené účinkem mikrovln generovaných kuchyňskou mikrovlnnou troubou – obr. 3, a také (ii) reakce směsi tetrachlorozlatité kyseliny a stříbrné soli (dusičnanu či acetátu) s BSA v alkalickém prostředí urychlené účinkem mikrovln. Uvedené dva typy nanoklastrů můžete využít rovněž v praktické úloze fluorescenční mikroskopie.



Obr. 3. Schéma syntézy zlatých nanoklastrů s BSA – převzato z literatury [16].

Reference:

- [1] http://www.britishmuseum.org/research/collection_online/collection_object_details.aspx?objectId=61219&partId=1
- [2] Freestone I., Meeks N., Sax M., Higgitt C.: The Lycurgus Cup – A Roman Nanotechnology. *Gold Bulletin* 2007, 40/4, 270-277
- [3] Albrecht MG, Creighton J.A.: Anomalously Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 5215-5217
- [4] Jeanmaire D.L., Van Duyne R.P.: Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J. Electroanal. Chem.* 1977, 84, 1-20
- [5] Campion A., Kambhampati P.: Surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* 1998, 27, 241- 250
- [6] Abalde-Cela S., Carrega-Romero S., Coelho J.P., Guerrero-Martínez A.: Recent progress on colloidal metal nanoparticles as signal enhancers in nanosensing. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2016, 233, 255-270
- [7] Li-Xu W., Xiu-E J.: Bioanalytical applications of Surface-enhance infrared absorption spectroscopy. *Chin. J. Anal. Chem.* 2012, 40, 975-982
- [8] Lane L.A., Qian X., Nie S.: SERS nanoparticles in medicine: from label-free detection to spectroscopic tagging. *Chem. Rev.* 2015, 115, 10489-10529
- [9] Muehlethaler C., Leona M., Lombardi J.R.: Review of Surface Enhanced Raman Scattering application in forensic science. *Anal. Chem.* 2016, 88, 152-169
- [10] Shang L., Dong S., Nienhaus G.U.: Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: synthesis and biological applications. *Nano Today* 2011, 6, 401-418
- [11] Yu Y., Geng J., Ong E.Y.X., Chellappan V., Tan Y.N.: Bovine serum albumin protein-templated silver nanocluster (BSA-Ag13): An effective singlet oxygen generator for photodynamic cancer therapy. *Adv. Healthcare Mater.* 2016, 1-8
- [12] Dutta D., Chattopadhyay A., Ghosh S.S.: Cationic BSA templated Au-Ag bimetallic nanoclusters as a theranostic gene delivery vector for HeLa cancer cells. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2016, 2, 2090-2098
- [13] Ganguly M., Jana J., Pal A., Pal T.: Synergism of gold and silver invites enhanced fluorescence for practical applications. *RSC Adv.* 2016, 6, 17683-17703
- [14] Xie J., Zheng Y., Ying J.Y.: Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 888-889
- [15] Zheng B., Zheng J., Yu T., Sang A., Du J., Guo Y., Xiao D., Choi M.M.F.: Fast microwave-assisted synthesis of AuAg bimetallic nanoclusters with strong yellow emission and their response to mercury(II) ions. *Sens. Actuators, B* 2015, 221, 386-392
- [16] Hsu N.Y., Lin Y.W.: Microwave-assisted synthesis of bovine serum albumin-gold nanoclusters and their fluorescence-quenched sensing of Hg²⁺ ions. *New J. Chem.* 2016, 40, 1155-1161